Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Universität München
Direktor: Professor Dr. Dr. h. c. Th. Bücher

Zur Kinetik der Enolase aus Kaninchenmuskel

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin verfaßt
und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
HELMUT SIES
aus Goslar

München 1967

AUS DEM PHYSIOLOGISCH-CHEMISCHEN INSTITUT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Professor Dr. Dr. h. c. TH. BÜCHER

ZUR KINETIK DER ENOLASE AUS KANINCHENMUSKEL

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Helmut Sies

aus Goslar

München 1967

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. Dr. h. c. Th. Bücher

Dekan: Professor Dr. M. Kiese

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Juni 1967

Fotodruck: Frau Elly Huth, Tübingen

MEINEN ELTERN

Meinem Lehrer,

Herrn Professor Dr. Dr. h. c. Theodor Bücher,

danke ich für die Überlassung des Themas der Dissertation und die stete Förderung.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis

Einführung 1

Methodik 6

Auswertung 8

Ergebnisse 9

Diskussion 14

Zusammenfassung 20

Literaturverzeichnis 21

Einführung

Zwei-Partner-Reaktionen, die durch hohe zelluläre Enzymaktivitäten katalysiert werden, haben in letzter Zeit für die Berechnung der Flußgeschwindigkeit von Stoffwechselketten Bedeutung gewonnen. Sofern sich nämlich die Konzentrationen der Reaktionspartner genügend nahe dem Gleichgewicht befinden, läßt sich die Stoffwechselgeschwindigkeit im zellulären Fließgleichgewicht (V_{St}) errechnen aus der Kombination von Messungen (a) der zellulären Enzymaktivität, (b) der Auslenkung der Reaktionspartner aus dem Gleichgewicht und (c) den unter Modellbedingungen gemessenen kinetischen Parametern des Enzyms. Hierzu haben Bücher sowie Hess [1-4] die von Hammes und Alberty [5] in die Enzymkinetik eingeführte "Steady State Relaxation Time" (τ_{SS}) herangezogen.[x)]

$$\text{Flußgeschwindigkeit} = \frac{\text{Auslenkung}}{\text{"Steady State Relaxation Time"}}$$

$$V_{St} = \frac{\Delta [A]}{\tau_{SS}} \qquad (1)$$

τ_{SS} entspricht einer reziproken Reaktionskonstante erster Ordnung; ihre Messung in vitro geschieht mit Hilfe hinreichend kleiner Auslenkungen im "Steady State" des Enzym-Substrat- und Enzym-Produkt-Komplexes.[xx)] In der Anwendung derartiger zellphysiologischer Überlegungen auf das Glykolyse-System haben sich Bücher und Rüssmann [3] mit der Enolase und der Enolasereaktion

$$2\ \text{Phosphoglycerat} \underset{}{\overset{Mg^{++}\text{-Enolase}}{\rightleftharpoons}} \text{Phosphoenolpyruvat} + \text{Wasser}$$

---

x) s. nächste Seite
xx) s. nächste Seite

beschäftigt. Unter physiologischen Bedingungen kann dieses System praktisch als Zwei-Partner-Reaktion behandelt werden. Vorläufige Messungen für τ_{SS} wurden eingesetzt; deren weitere Ausarbeitung war wünschenswert.

---

x) Abkürzungen:

τ_{SS}	= "Steady State Relaxation Time"
V_{St}	= Stationäre Flußgeschwindigkeit der Stoffwechselkette
$[A]_0$, $[P]_0$	= Initiale Konzentration der Reaktionspartner A und P
$\overline{[A]}$, $\overline{[P]}$	= Gleichgewichtskonzentrationen der Reaktionspartner
$\Delta [A] = [A] - \overline{[A]}$	= Auslenkung aus dem Gleichgewicht
$[S] = [A] + [P]$	= Summe der Konzentrationen der Reaktionspartner
V_1 , V_2	= Maximalgeschwindigkeit in Vorwärts- und Rückrichtung
V_0	= Anfangsgeschwindigkeit
K_a, K_p, K_m	= Michaeliskonstanten
K_{app}	= Im Ionenmilieu des Experiments gemessene Massenwirkungskonstante
k	= Reaktionskonstante
2-PGS	= 2-Phosphoglycerat
PEP	= Phosphoenolpyruvat
EN	= Enolase

xx) Vergleiche auch die Fußnote auf Seite 429 in [3b] zu den Begriffen "steady" und "stationary" state.

Kinetische Untersuchungen am Enolase-System sind in den letzten 25 Jahren am Hefe-, Kartoffel- und Muskelenzym angestellt worden [6-10]. Die Kinetik bei Substratsättigung haben erstmals Warburg und Christian [6] in einer Arbeit über das Hefe-Enzym untersucht. Sie haben aufgezeigt, daß die Enolase-Reaktion nach der ersten Ordnung verläuft[xxx].

$$-\frac{d[A]}{dt} = k \cdot [A]_t \qquad (2)$$

Für die Reaktionskonstante k haben sie eine Beziehung folgender Form gefunden:

$$k = \frac{a}{[A]_o} \qquad (3)$$

Infolgedessen gilt unter den experimentellen Bedingungen Warburgs für die "Steady State Relaxation Time" des Hefe-Enzyms bei beliebig großer Auslenkung

$$\tau_{ss} = \frac{[A]_o}{a} \qquad (3a)$$

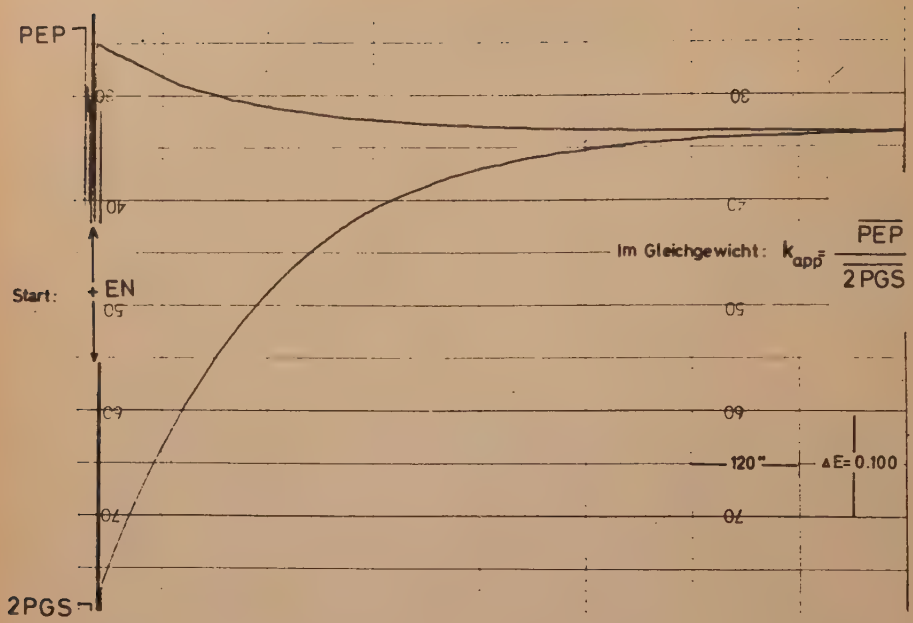
Diese Befunde sind mit der Michaelis-Haldane-Theorie vereinbar, sofern angenommen wird, daß für Substrat A und Produkt P die gleiche Michaeliskonstante K_m gilt ($K_a = K_p$) sowie außerdem $[A]_o \gg K_m$ ist. Die allgemeine "Steady State"-Geschwindigkeitsgleichung der enzymatisch katalysierten Zwei-Partner-Reaktion [5]:

$$-\frac{d[A]}{dt} = \frac{V_1 \frac{[A]}{K_a} + V_2 \frac{[P]}{K_p}}{1 + \frac{[A]}{K_a} + \frac{[P]}{K_p}} \qquad (4)$$

$$\frac{V_1 K_p}{V_2 K_a} = K_{app} \qquad (4a)$$

---

xxx) In der Zeichengebung von Warburg und Christian [6] bedeuten in Gleichung (2) und (3) $k = (\omega + \beta)$; $[A]_o = C$ und $a = (k_1 + k_2) F$.



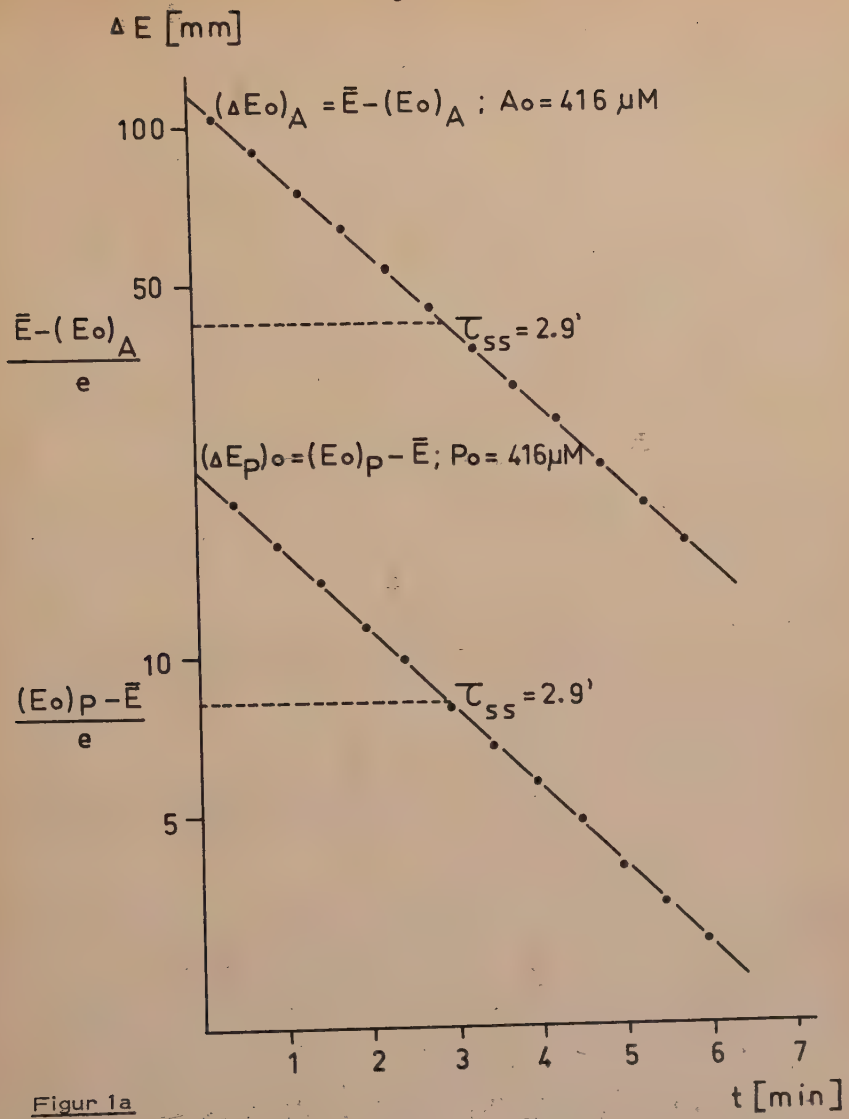
Figur 1

Originalregistrierung von zwei kinetischen Experimenten. Einstellung des Gleichgewichts nach Zugabe von 1 µg Enolase (EN). Zeitschreibung von links nach rechts.

Obere Kurve: Vor dem Start der Reaktion befinden sich 416 µM PEP im Ansatz. Nach Enzymzugabe fällt die Extinktion auf den Gleichgewichtswert ab: $(\Delta E_P)_o = (E_o)_P - \bar{E}$.

Untere Kurve: Im Ansatz 416 µM 2-PGS. Die Extinktion steigt auf den Gleichgewichtswert an: $(\Delta E_A)_o = \bar{E} - (E_o)_A$.

100 mM Imidazol-HCl, 8 mM $MgSO_4$, pH 6.8, 37° C, Schichtdicke 1 cm, Testvolumen 2.0 ml. Messung bei 240 nm.



Figur 1a

Auswertung der Kinetik im halblogarithmischen Netz. Auftragung der Extinktionsdifferenzen ΔE_A bzw. ΔE_P gegen die Zeit t. Die Punkte liegen auf einer Geraden (Zeitgesetz 1. Ornung). Zur Zeit τ_{SS} ist die Extinktionsdifferenz ΔE von $(\Delta E)_o$ auf $(\Delta E)_o/e$ abgeklungen.

ergibt unter solchen Voraussetzungen

$$a = V_1 + V_2 \qquad (3b)$$

Unter der gleichen Annahme $K_a = K_p$, jedoch bei Substratkonzentrationen, die der Michaeliskonstante vergleichbar sind, behält (3a) die Form einer Gleichung ersten Grades. Sie erhält jedoch eine additive Konstante:

$$\tau_{SS} = \frac{1}{k} = \frac{[A]_0}{a} + b \qquad (5)$$

Darin sind:

$$a = V_1 + V_2 \quad ; \quad b = \frac{K_m}{V_1 + V_2} \qquad (5a)$$

Wie meine Messungen zeigen, (Fig. 1 und 2) beschreiben diese Gleichungen (5) und (5a) befriedigend die Kinetik der Enolase aus Kaninchenmuskel bei allen zellphysiologisch bedeutsamen Spiegeln der Metabolite und Wasserstoff-Ionen.

Methodik

Substanzen x)

2- Phosphoglycerat stand als kristallines tri-Natriumsalz ($C_3H_4O_7PNa_3 \cdot 6\,H_2O$), MG = 360,1, zur Verfügung. Phosphoenolpyruvat wurde als mono-Natriumsalz ($C_4H_4O_6PNa \cdot H_2O$), MG = 208,0, verwendet. Die Kristalle wurden in Wasser gelöst, mit 1 n NaOH auf pH 6.5 eingestellt und in 50 mM-Konzentration eingefroren. Für die kinetischen Experimen-

---

x) Herrn Dr. H. U. Bergmeyer, C. F. Boehringer & Söhne, GmbH, Biochemische Abteilung, Tutzing, danke ich für die Präparate.

te wurde auf 3-5 mM verdünnt und die Konzentration enzymatisch (Laktatdehydrogenase als Indikatorreaktion [11]) bestimmt. Die Reinheitsprüfung ergab, daß ein Mol ungetrocknet eingewogene 2 PGS 0,98 Mole DPNH oxidierte, während 1 Mol PEP 0,95 Mole DPNH oxidierte.

Enolase wurde von Czok und Bücher [12] aus Kaninchenmuskel kristallisiert (spez. Aktivität 48 µMol PEP/min · mg Biuret-Protein). Fremdaktivitäten: LDH 0,33 %, PK 0,12 %, GPM./., PGK 0,12 %, GAPDH ./., TIM 0,49 %, GDN./., ADK 0,37 %. Das Präparat kann jahrelang bei 4° C ohne Aktivitätsverlust in Ammoniumsulfat gelagert werden. Für kinetische Versuche wurde gegen 0,01 Phosphatpuffer, pH 7,5, 2mM EDTA, dialysiert. Zur Enzymverdünnung wurden 2,5 % Glycerin zugesetzt, um sie spezifisch schwerer als das Testgemisch zu machen. Dieser Zusatz beeinflußt nicht die Aktivität, hilft jedoch Verluste zu vermeiden.

Die Enzymaktivität wurde in Standard-Einheiten unter den bei [11] angegebenen Bedingungen bestimmt. Bei der Temperatur der kinetischen Versuche, 37° C, beträgt die Aktivität das 2,13-fache derjenigen bei 25° C im Standardtest. Für Hefeenolase wurde bei 30° C die 1,64-fache Aktivität derjenigen bei 25° C gemessen [13].

Puffer

Alle Messungen wurden in 100 mM Imidazolpuffer durchgeführt. Man erhält höhere Geschwindigkeiten als z.B. in Phosphat-, Bikarbonat- oder TRIS-Puffer [8]. Die Wasserstoffionenkonzentration wurde mit 1 n HCl eingestellt. Die Ionenstärke wurde durch Zusatz von 0,2 M KCl konstant bei μ = 0,31 M gehalten. Die unter diesen Bedingungen optimale Magnesiumkonzentration von 8 mM wurde verwendet. Ohne KCl beträgt die optimale Mg^{++} - Konzentration etwa 1/10. Wold und Ballou [8] machen dafür neben unspezifischen Ionenstärkeeffekten einen spezifischen Effekt der Gegenwart von K^{+} auf die Bindung des Mg^{++} verantwortlich.

Messung

Die Messungen wurden an einem registrierenden Spektrophotometer (Gilford Model 2000) bei 240 nm durchgeführt. Es wurde mit konstanter Spaltbreite (0,4 mm) gearbeitet. In der Quarzküvette von 1 cm Schichtdicke befindet sich vor dem Start der Reaktion:

1.000 ml Imidazolpuffer, 0,100 bis 0,300 ml Substrat bzw. Produkt, Wasser ad 1,970 ml. Nach 15-minütigem Temperieren bei 37° C wird mit 0,050 ml temperierter Enolaselösung (3,2 µg) gestartet. Während der Injektion des Enzyms wird mit einem Teflonstab umgerührt.

Auswertung

Zur graphischen Ermittlung von τ_{SS} wurden die Extinktionsdifferenzen zwischen Punkten der Kinetik und der Gleichgewichtsextinktion in üblicher Weise im halblogarithmischen Netz gegen die Zeit aufgetragen (Figur 1a). Die Meßwerte - im Bereich einer Größenordnung der Extinktionsdifferenzen - wurden durch entsprechende Variation der Zeitachse so gelegt, daß die Steigung ca. 45° beträgt, da bei diesem Winkel die Projektion der Geraden auf die Zeitachse am wenigsten fehlerhaft ist.

Einige Faktoren können den Bereich zuverlässiger Auswertung einschränken. Abgesehen vom Rauschen des Photometers sind es zu Beginn der Reaktion zum Beispiel Rühreffekte und Registrierträgkeit, am Ende der Kinetik Inkonstanz der Photometerjustierung und möglicherweise Zerfall des Enzyms und Substrats. Diese Faktoren haben für Kinetiken, die mit 2-PGS gestartet werden, mehr am Beginn (vgl. auch 'Ergebnisse'), für die mit PEP gestarteten mehr am Ende der Kurven Bedeutung. Im allgemeinen wurde zur Bestimmung der Gleichgewichtsextinktion nach sieben Halbwertzeiten abgelesen und die erhaltene Extinktionsdifferenz um 0,78 % erhöht.

Ergebnisse

Gleichgewichtskonstante und Extinktionskoeffizient

Die apparente Gleichgewichtskonstante $K_{app} = \overline{[PEP]} / \overline{[2PG]}$ ist eine Funktion der Wasserstoff- und der Metallionenkonzentration. Aus den Ionisations- und den Metallbindungskonstanten berechneten Wold und Ballou [l. c.] die pH- und metallunabhängige Gleichgewichtskonstante $K_{app} = 6,3$ bei 25° C. Bei 37° C liegen die K_{app} höher (Tabelle 1), d. h. die Enolasereaktion verläuft in Richtung zum PEP endotherm. K_{app} ist ionenstärkeabhängig. Ohne Zusatz von KCl ist die Gleichgewichtskonstante bei pH 6,83 nur 5,1.

Aus der Tabelle 1 gehen außerdem die Extinktionskoeffizienten hervor (Messung am Beckman-Photometer DK 1). Das voll dissoziierte PEP absorbiert am stärksten. Die Absorption sinkt mit der Ionenstärke. Im Medium ohne KCl ist $E_{240} = 1280 (M^{-1} cm^{-1})$ bei pH 6,83. Unter Berücksichtigung von Ionenstärke und Temperatur sind die angegebenen Koeffizienten mit denen von Wold und Ballou [l. c.] angegebenen in Übereinstimmung.

Tabelle 1

pH-Abhängigkeit der apparenten Gleichgewichtskonstanten K_{app} und des molaren Extinktionskoeffizienten E_{240} des Phosphoenolpyruvats der Enolasereaktion in 0,1 M Imidazol, 0,008 M $MgSO_4$, 37° C, μ = 0,31 (Zusatz von 0,2 M KCl).

pH	6.4	6.9	7.5
K_{app}	4,7	5,8	6,7
$E_{240} (M^{-1} cm^{-1})$	1280	1390	1430

Kinetik

Tabelle 2 gibt einen Überblick. Jeweils fünf bzw. vier verschiedene initiale Konzentrationen von PEP und 2PGS wurden bei drei verschiedenen Wasserstoff-Ionen-Konzentrationen im Bereich zwischen pH = 6,4 bis 7,5 eingesetzt. Innerhalb dieses Bereiches ist die Kinetik mit der gewählten Versuchsanordnung mit etwa gleicher Zuverlässigkeit meßbar. Die Enzymkonzentration (1,6 µg/ml), die Temperatur (37° C), die Ionenstärke (μ = 0,31), die Konzentration der Mg^{++}-Ionen (8mM) und der K^+ - Ionen (200 mM) waren in allen Ansätzen die gleichen. Die Zahlenwerte in der Tabelle sind Mittelwerte aus drei Versuchen.

Tabelle 2

Auswertung der kinetischen Experimente (Mittelwerte aus jeweils drei Ansätzen). Abhängigkeit der "Steady State Relaxation Time" τ_{SS} von der initialen Substratkonzentration. 0,1 M Imidazol, 0.008 M $MgSO_4$, 0,2 M KCl, Enolase 1,6 µg/ml, Ionenstärke μ = 0,31, Temperatur 37° C, Testvolumen 2,02 ml, Schichtdicke 1 cm, Messung bei 240 nm.

Zur Berechnung von τ_{SS} siehe Abb. 1a. Berechnung der Anfangsgeschwindigkeiten V_0 bzw. V_i nach Gleichung (2):

$$V_0 = \Delta[A]_0 / \tau_{SS} .$$

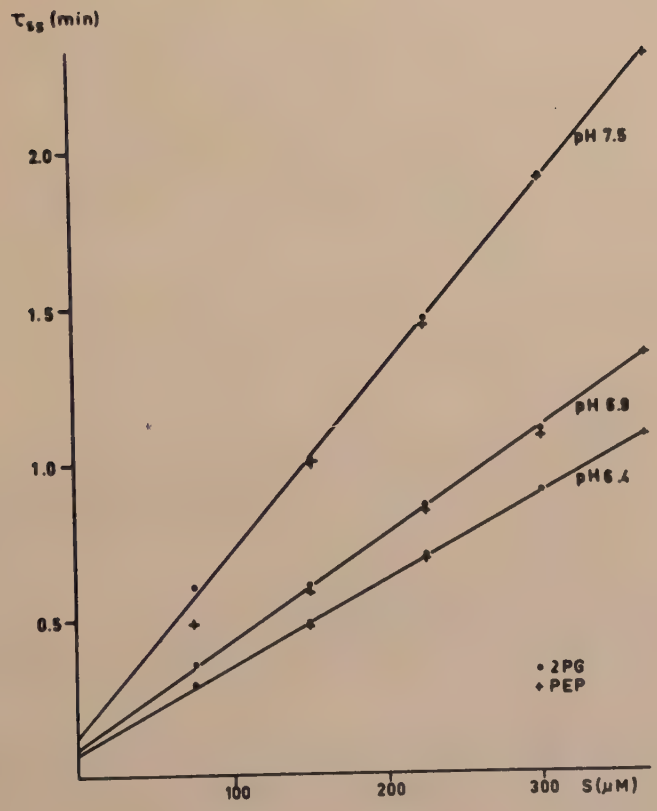
(Initiale Substratkonzentration [S] in 10^{-6}M; τ_{SS} in min.; Anfangsgeschwindigkeit in 10^{-6} M/min.)

Tabelle 2, Fortsetzung.

[S]	$\overline{[PEP]}$	$\overline{[2PG]}$	$\tau_{SS(2PG)}$	$\tau_{i(2PG)}$	$\tau_{SS(PEP)}$	$v_{0(2PG)}$	$v_{i(2PG)}$	$v_{0(PEP)}$
				pH = 6,4; K_{app} = 4,8				
375	310	65	---	---	1,09	---	---	59,6
300	248	52	0,91	0,96	0,91	273	260	57,6
225	186	39	0,70	0,75	0,69	264	250	56,3
150	124	26	0,49	0,52	0,48	254	239	54,5
75	62	13	0,35	0,37	0,36	180	174	30,9
				pH = 6,9; K_{app} = 5,8				
375	320	55	---	---	1,36	---	---	40,5
300	256	44	1,11	1,21	1,08	231	212	40,8
225	192	33	0,87	0,95	0,85	221	204	38,8
150	128	22	0,61	0,66	0,58	210	195	37,9
75	64	11	0,35	0,37	0,36	180	174	30,9
				pH = 7,5; K_{app} = 6,7				
375	326	49	---	---	2,35	---	---	20,7
300	261	39	1,92	2,17	1,91	136	120	20,4
225	196	29	1,47	1,66	1,44	134	118	20,2
150	131	19	1,05	1,16	1,06	124	113	18,4
75	65	10	0,61	0,64	0,49	108	103	19,9

Zu prüfen war, inwieweit - entsprechend Gleichung (2) - die Kinetik exakt nach der ersten Ordnung abläuft. Bildete PEP das initiale Substrat, so war unter keiner der gewählten Bedingungen eine systematische Abweichung von der Linearität in Auftragungen nach Figur 1a zu beobachten. Dagegen wurden geringe Abweichungen von der Geradlinigkeit bei den mit 2-PGS beginnenden Kinetiken festgestellt, besonders bei jenen mit hoher initialer Substratkonzentration. Die Anfangsgeschwindigkeit wird hier bis zu 10 % kleiner beobachtet als bei exakt exponentieller Kinetik zu erwarten. In Tabelle 2 ist diese Abweichung in der mit τ_i bezeichneten Spalte erfaßt worden. τ_i repräsentiert die Steigung jener Gerade, welche durch die ersten drei Meßwerte ($\Delta[A]$ = 0,9 bis 0,7 ($[A]_0 - \overline{[A]}$)) gelegt wird. Entsprechend der kleineren Anfangsgeschwindigkeit ist τ_i größer als τ_{SS} ($\Delta[A]$ = 0,7 bis 0,1 ($[A]_0 - \overline{[A]}$)). Die mit Hilfe von τ_i berechneten Anfangsgeschwindigkeiten findet man in der vorletzten Spalte der Tabelle bezeichnet mit $(V_i)_{2PG}$. Zu bedenken ist, daß die mit dem Start verbundene Inkontinuität sich umso weitergehend auswirkt, je rascher die Reaktion abläuft. Tatsächlich ist bei Start mit 2-PGS die Anfangsgeschwindigkeit 5 bis 7-fach höher als bei der entsprechenden Rückreaktion. Die Abweichungen sind von der Größenordnung des mittleren Fehlers.

Abgesehen von der Startphase der 2-PGS-Reaktion ist die Übereinstimmung der in Vorwärts- und Rückwärtslauf gefundenen Relaxationszeiten befriedigend (Tab. 2). Für kleinere Ablenkungen war sie aus thermodynamischen Gründen zu fordern. Insofern zeigen die Daten für $(\tau_{SS})_{2PG}$ und $(\tau_{SS})_{PEP}$ in Tabelle 2, daß die zahlreichen methodischen Probleme mit Ausnahme eines Experiments - $[PEP]_0$ = 75 μM bei pH 7,47 - befriedigend gelöst worden sind. Daß τ_{SS} unter allen gewählten Bedingungen bei beliebig großen Auslenkungen bestimmt werden kann, hat neben den eingangs behandelten Konsequenzen bezüglich der kinetischen Parameter den praktischen Vorteil, daß günstige Voraussetzungen für die Anwendung der Relaxationszeit auf die Berechnun-



Figur 2

Abhängigkeit der 'Steady State Relaxation Time' τ_{ss} von der Gesamtsubstratkonzentration [S] sowie der Wasserstoffkonzentration. Daten der Tabelle 2.

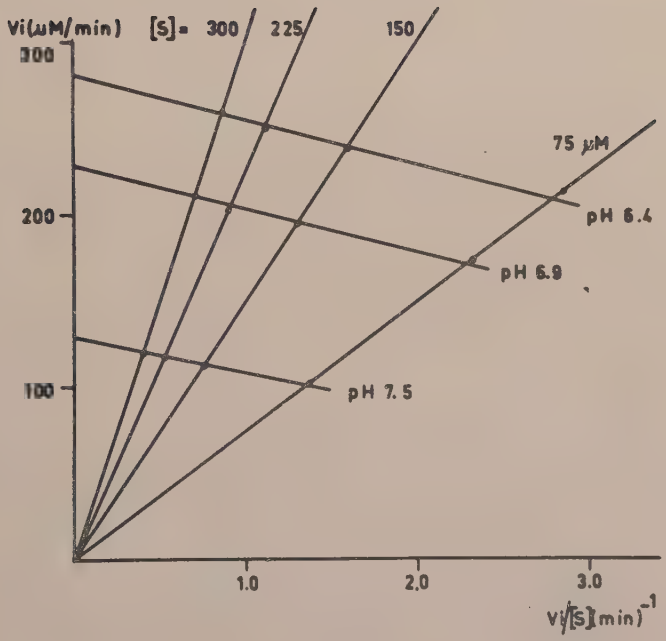
gen von Stoffwechselflußgeschwindigkeiten mit Hilfe des Enolasesystems existieren.

In Figur 2 geben wir die Auftragung der 27 beobachteten Mittelwerte für τ_{ss} gegen die Gesamtkonzentration [S] der Metabolite. Für jede der drei Versuchsreihen liegen die Werte jeweils auf einer Geraden. Steigungen und Ordinatenabschnitte dieser Geraden erweisen sich als abhängig von der Wasserstoffionenkonzentration. Ihre Zahlenwerte sind in den oberen Zeilen von Tabelle 3 enthalten. Mit Hilfe der unabhängig bestimmten Gleichgewichtskonstanten (Tab. 1) errechnet man nach Gleichung (4a), (5) und (5a) kinetische Parameter, die für jede Versuchsreihe in den jeweils linken Spalten der drei unteren Zeilen verzeichnet sind.

Eine andere Verteilung der Gewichte der Einzelmessung gibt die Transformation nach Eadie: V_0 vs. $V_0/[S]$, [14]. In Figur 3 wurden die oben besprochenen initialen Werte V_i der 2-PGS-Reaktion dazu herangezogen. Die Ergebnisse sind in den rechten Spalten der Tabelle 3 enthalten. Man erkennt, daß die Werte für K_m bei allen Auswertungsverfahren und Reaktionspartnern innerhalb der Fehlergrenze übereinstimmen.

Diskussion

Unter sonst identischen Bedingungen wird im vorliegenden Material die Konzentration der Substrate 5-fach und die Konzentration der Wasserstoffionen 12-fach variiert. Erheblich verschiedene Anfangs- und Maximalgeschwindigkeiten werden registriert. Der Charakter der Kinetik bleibt dagegen unverändert. Wie weitgehend exakt dabei das Zeitgesetz erster Ordnung erfüllt ist, ist die experimentell entscheidende Frage. Die weiteren Folgerungen der Michaelis-Kinetik -- $K_a = K_p$; $V_1/V_2 = K_{app}$ -- leiten sich daraus unmittelbar ab. Gewisse Abweichungen - zwar in der



Figur 3

Auswertung der initialen Werte V_i der 2-PGS-Reaktion aus Tabelle 2 in der Transformation nach Eadie. Die Resultate sind in der rechten Spalte der Tabelle 3 enthalten.

Tabelle 3

Kinetische Konstanten der Enolasereaktion (1,6 µg Enzym/ml) in Abhängigkeit vom pH. Versuchsbedingungen wie in Tabelle 2. Auswertung von Fig. 2 (τ_{SS} vs. [S]) und Fig. 3 (V_i vs. $V_i/[S]$) für die mit 2-PGS beginnende Kinetik. Die mit PEP beginnende Kinetik wird nach Fig. 3 mit den Werten $(V_0)_{PEP}$ aus Tab. 2, letzte Spalte, ausgewertet.

pH	6,4		6,9		7,5	
Auswertung mit:	τ_{SS} vs. [S]	V_0 vs. $V_0/[S]$	τ_{SS} vs. [S]	V_0 vs. $V_0/[S]$	τ_{SS} vs. [S]	V_0 vs. $V_0/[S]$
Ordinatenabschnitt (min)	0,075		0,085		0,120	
Steigung (min/µM)· 10^{-3}	2,75		3,45		6,00	
K_m (µM) 2PG:	27,5	26	25	24	20	21
PEP:		30		26		24
V_1 (µM/min)	300	281	247	228	146	130
V_2 (µM/min)	64	64	43	44	22	22

Größenordnung des mittleren Fehlers der Einzelmessung, jedoch systematischer Natur - wurden in der Initialphase aller Milieubedingungen beim Start mit 2-PGS beobachtet. Wahrscheinlich sind sie methodisch bedingt. Größere Exaktheit der Messungen wäre wünschenswert, mit der gewählten Anordnung ist die jedoch nicht erreichbar. Für die gegebenen Ionen-Zusammensetzungen- und -stärke finden wir Werte für $K_a = K_p$ zwischen 30 und 24 µM. Sowohl bezüglich der Gleichheit beider Michaeliskonstanten als auch hinsichtlich der Geringfügigkeit ihres Ganges mit der Wasserstoff-Ionen-Konzentration sind Differenzen zu früheren Angaben in der Literatur [7, 8, 9, 15] zu vermerken. Die Bedeutung der Gleichung der K_m für die kinetische Theorie des "Steady State" wurde von Miller und Alberty [16] eingehend untersucht.

Zeitgesetze erster Ordnung sind für die Mehrzahl der bislang untersuchten Zwei-Partner-Reaktionen beschrieben worden [17 - 19]. Die aus diesen Gegebenheiten zu folgernde Gleichheit der Michaeliskonstanten, trotz teilweise erheblicher konstitutioneller Unterschiede von Substrat und Produkt, ist ein interessantes Phänomen.[xxxx)] Seine Erklärung liegt jenseits der Möglichkeiten der "Steady-State" -Kinetik.

Eine wichtige zellphysiologische Konsequenz dieser Gegebenheit besteht in der besonderen Übersichtlichkeit der Beziehungen zwischen Flußgeschwindigkeit und den Metabolitspiegeln.

Für die zellphysiologische Anwendung der gewonnenen Daten ist gemäß Ansatz [3]

$$(\tau_{SS} \cdot V_1)_{\text{zellulär}} = (\tau_{SS} \cdot V_1)_{\text{in vitro}} \qquad (6)$$

weniger der gemessene Wert für τ_{SS} als vielmehr sein Produkt mit der Maximalgeschwindigkeit V_1 bedeutungsvoll. Beziehungen (4a, 5, 5a) zu-

- - - - -

xxxx) Es ist zu bemerken, daß in den zitierten Untersuchungen [17-19] die K_m-Werte nur bei einer Versuchskonstellation gleich angegeben wurden.

folge, ist unter den für Enolase geltenden Bedingungen

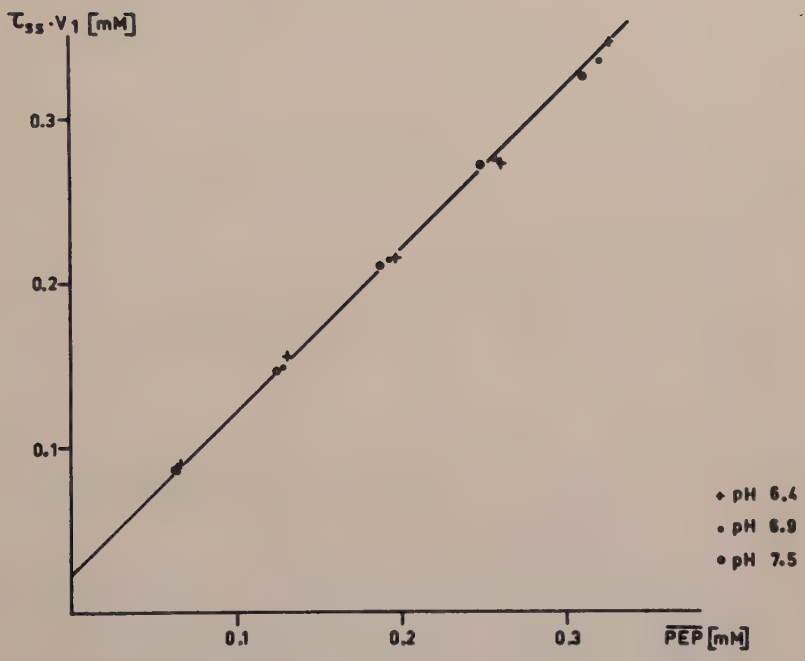
$$\tau_{SS} \cdot V_1 = [P] + K_m \frac{K_{app}}{1+K_{app}} \qquad (7)$$

In Figur 4 sind Werte $\tau_{SS} V_1$ - aus Tabelle 2 entnommen - für alle Substrat- und H-Ionen-Konzentrationen dieser Untersuchung eingetragen worden. Die erhaltene Kurve entspricht den theoretischen Erwartungen. Darüber hinaus zeigt sich, daß die additive Konstante - und damit die Beziehung selbst - weitgehend unabhängig von der Wasserstoff-Ionen-Konzentration ist. Gegenläufige Bewegungen von K_m und K_{app}, sowie die Geringfügigkeit der Änderungen überhaupt, sind die Ursache. Mit Hilfe der Werte in Tabelle 3 errechnet man für das additive Glied in (7) 23 mM bei pH = 7, 5 und 20 mM bei pH = 6, 4.

Die Beziehung

$$\tau_{SS} \cdot V_1 = \overline{PEP} + 0,02$$

dürfte somit allen zellulär vorkommenden Variationen des Milieus gerecht werden.



Figur 4

Abhängigkeit des Produktes $\tau_{ss} \cdot V_1$ von der Gleichgewichtskonzentration $\overline{[PEP]}$ des Phosphoenolpyruvats. Erklärung siehe Text.

Zusammenfassung

Das Enolasesystem ist als Zwei-Partner-Reaktion für die Berechnung der Flußgeschwindigkeit in der Glykolysekette interessant. Am in-vitro-System mit dem Kaninchenmuskelenzym wurden die kinetischen Parameter für alle zellphysiologisch bedeutsamen Spiegel der Metabolite 2-Phosphoglycerinsäure und Phosphoenolbrenztraubensäure und der Wasserstoffionen untersucht.

Die "Steady State Relaxation Time" τ_{SS} ist bei den Substratkonzentrationen der Zelle, die der Michaeliskonstante vergleichbar sind, zu formulieren als

$$\tau_{SS} = \frac{1}{k} = \frac{A_0}{V_1 + V_2} + \frac{K_m}{V_1 + V_2} \quad ,$$

bei Gleichheit der Michaeliskonstanten ($K_a = K_p = K_m$).

Die vorliegenden Messungen bestätigten diese Beziehung. Die Reaktion folgt einem Zeitgesetz I. Ordnung. Für Hin- und Rückreaktion gilt die gleiche "Steady State Relaxation Time". Inwieweit geringfügige Abweichungen von der Kinetik I. Ordnung bestehen, war mit der gewählten Anordnung nicht vollständig zu klären.

Im überstrichenen pH-Bereich gelten Werte der Michaeliskonstanten K_m zwischen 24 und 30 µM.

Eine wichtige zellphysiologische Konsequenz liegt in der besonderen Übersichtlichkeit der Beziehung zwischen Flußgeschwindigkeit und der Deviation des Enolasesystems. Die Beziehung $\tau_{SS} V_1 = \overline{[PEP]} + 0.02$ dürfte den zellulär vorkommenden Variationen des Milieus gerecht werden.

Neue Daten der Extinktionskoeffizienten des Phosphoenolpyruvats und der Gleichgewichtskonstante $K_{app} = V_1/V_2$ werden vorgelegt.

Literaturverzeichnis

1. Bücher, Th. in: 7. Symposium der Deutschen Gesellschaft f. Endokrinologie. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1961 p. 129.

2. Schimassek, H. - Kadenbach, B. - Rüssmann, W. - Bücher, Th. in: G. Weber: Advances in Enzyme Regulation. London: Pergamon Pr. 1963 Vol. 1. p. 103.

3. Bücher, Th. - Rüssmann, W.: a) Angew. Chem. 75, 881 (1963) b) Angew. Chem. Int. Ed. 3, 426 (1964)

4. Hess, B. in: P. Karlson: Funktionelle und morphologische Organisation der Zelle. Berlin, Göttingen, Heidelberg 1963.

5. Hammes, G.G. - Alberty, R.A.: JACS 82, 1564 (1960)

6. Warburg, O. - Christian, W.: Bio. Z. 310, 384 (1942)

7. Boser, H. Z. physiol. Chem. 315, 163 (1959)

8. Wold, F. - Ballou, C. JBC 227, 313 (1957)

9. Holt, A. - Wold, F. JBC 236, 3227 (1961)

10. Malmström, B. in: Boyer, Lardy, Myrbäck, eds.: "The Enzymes" Vol. 5, 455.

11. Bücher, Th. - Luh, W. - Pette, D. in: Hoppe-Seyler/Thierfelder, 10. Aufl. Bd. VI/A 1964, S. 292.

12. Czok, R. - Bücher, Th. Adv. Prot. Chem. 15, 315 (1960)

13. Westhead, E.W. - McLain, G.S. : JBC 239, 2464 (1964)

14. Eadie, G.S. JBC 146, 85 (1942)

15. Bealing, J.F. - Czok, R. - Eckert, L. - Jäger, I. (1960) unveröffentlicht

16. Miller, W.G. - Alberty, R.A. : JACS 80, 5146 (1958)

17. Beisenherz, G. Methods of Enzymology 1, 387 (1955)

18. Tsuboi, K.K. - Estrada, J. - Hudson, P.B.: JBC 231, 19 (1958)

19. Bock, R.M. - Alberty R.A.: JACS 75, 1921 (1953).

LEBENSLAUF

Am 28. März 1942 wurde ich als Sohn des Geschäftsführers Ernst Sies und seiner Ehefrau Ilse, geb. Siegmund, in Goslar geboren.

Von 1948 - 1952 besuchte ich die Volksschule Seesen, ab 1952 das Gymnasium Seesen, wo ich 1961 das Abitur ablegte. Von 1959 - 1960 verbrachte ich ein Jahr als Austauschschüler in USA; dort erhielt ich das High School Diplom.

Das Medizinstudium begann ich 1961 an der Universität Tübingen. Dort war ich Student am Leibniz-Kolleg. 1962 setzte ich das Studium in München fort; 1963 legte ich das Physikum ab.

Ab 1963 arbeitete ich an meiner Dissertation, zunächst in Marburg/Lahn, dann in München. Das Wintersemester 1964/65 verbrachte ich an der Universität Paris.

Ende 1966 legte ich an der Universität München das Medizinische Staatsexamen ab.

Druckbüro Frau Elly HUTH, 74 Tübingen